



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07059572 A**(43) Date of publication of application: **07 . 03 . 95**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 27/447
G01N 33/50**(21) Application number: **05230870**(71) Applicant: **TOSOH CORP**(22) Date of filing: **24 . 08 . 93**(72) Inventor: **YAMAGISHI HIROAKI****(54) EXTRACTION OF NUCLEIC ACID AND
DETECTION OF SPECIFIC NUCLEIC ACID
SEQUENCE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To extract a nucleic acid in a stable extraction efficiency, while preventing aerosol pollution by adding dextran, etc., to a specimen, furthermore adding a specific reagent to the mixture to insolubilize the nucleic acid, etc., and subsequently separating the insolubilized nucleic acid, etc.

CONSTITUTION: A specimen is mixed with dextran, acrylamide and/or carbomethoxycellulose to obtain a mixture solution. The mixture solution is mixed with a reagent containing (A) a reagent such as guanidine thiocyanate or guanidine hydrochloride and (B) a reagent such as n-propyl alcohol or isopropyl alcohol to insolubilize a nucleic acid, the dextran, etc., which are separated from the liquid phase. Phenol and chloroform are not required.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-59572

(43) 公開日 平成7年(1995)3月7日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
C 1 2 Q 1/68		Z 9453-4B		
G 0 1 N 27/447		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00 A	
			G 0 1 N 27/ 26 3 2 5 E	
審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 16 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-230870

(22) 出願日 平成5年(1993)8月24日

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 山岸 裕明

神奈川県川崎市多摩区中野島4-3-31-205

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54) 【発明の名称】 核酸抽出及び特定核酸配列の検出方法

(57) 【要約】

【目的】 従来の操作よりも容易で工程が少なく、エアロゾル発生の可能性を減少でき、かつ短時間で実施可能で、フェノールやクロロホルムを使用せず、かつ核酸抽出効率が安定な核酸抽出方法、並びに特定核酸配列の検出方法を提供する。

【構成】 以下の工程からなる、核酸を含有する試料からの核酸抽出法：

(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアーを試料と混合して混合液を形成する工程、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、tert-ブチルアルコール及びtert-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、とを含む試薬Cを、工程(1)の混合液に混合して核酸及びキャリアーを不溶化する工程、(3) 不溶化された核酸及びキャリアーを液相と分

離する工程。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程からなる、核酸を含有する試料からの核酸抽出法：

(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアーを試料と混合して混合液を形成する工程、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール及び*tert*-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、とを含む試薬Cを、工程(1)の混合液に混合して核酸及びキャリアーを不溶化する工程、(3) 不溶化された核酸及びキャリアーを液相と分離する工程。

【請求項2】 以下の工程からなる、試料中の核酸の特定配列の検出方法：

(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアーを試料と混合して混合液を形成する工程、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール及び*tert*-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、とを含む試薬Cを、工程(1)の混合液に混合して核酸及びキャリアーを不溶化する工程、(3) 不溶化された核酸及びキャリアーを液相と分離する工程、(4) 分離された核酸がRNAである場合に逆転写反応により該RNAをDNAに変換する工程、

(5) 工程(3)で分離された核酸又は工程(4)で得られた核酸を、少なくとも特定配列を増幅するのに適したオリゴヌクレオチドプローブ、モノヌクレオチド三リン酸混合物、ポリメラーゼ及びインターカレーター性蛍光色素を含むポリメラーゼチェーンリアクション反応液中でPCR反応に供する工程、(6) PCR反応前後の蛍光強度変化又はPCR反応中の反応液からの蛍光強度変化を測定する工程、(7) 蛍光強度の変化から、試料中に特定配列を有する核酸が存在していたか否かを判定する工程。

【請求項3】 PCR反応及び蛍光強度変化の測定が、分離された核酸及びPCR反応液が密封された状態で実施されることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】 少なくとも次のキャリアー及び試薬を分離された状態で含む、核酸を抽出するための試薬セット。(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアー、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グ

ニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール及び*tert*-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、とを含む試薬C。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、核酸を含有する試料から核酸を抽出する方法に関するものであり、詳しくは、バイオテクノロジー、臨床診断分野で利用することができる核酸抽出法及び特定核酸配列の検出方法である。

【0002】

【従来の技術】 核酸を含有する試料からの核酸の抽出は、バイオテクノロジー、臨床診断等の分野では重要な操作である。例えば遺伝子組み換え技術ではベクターDNAやクローン化しようとするDNAの両方を単離することが必要であり、遺伝病や癌遺伝子について遺伝子検査を行うには、血液中の白血球細胞等から核酸を抽出することが必要である。

【0003】 一般的に、核酸は遊離の分子としては存在せず、例えば細菌、細胞、ウイルス粒子中等に存在し、蛋白質、脂質及び糖からなる細胞膜や細胞壁で覆われ、核酸自身ヒストン蛋白質等と複合体を形成している。このような状態で存在する核酸を抽出するには、核酸を覆う細胞膜や細胞壁を破壊し、前記複合体の蛋白質を変性又は分解して可溶化し、核酸を遊離させ、遊離した核酸を抽出する操作が必要である。

【0004】 核酸の抽出は、従来次のようにして行われている。プロテアーゼK等の蛋白質分解酵素や界面活性剤を加えて細胞膜や細胞壁を破壊し、複合体の蛋白質を分解して核酸を遊離させ、フェノール/クロロホルムを添加し、遠心分離して核酸を水相に分配させた後、分取した水相にエタノールやイソプロパノール等を添加して核酸を不溶化させる、いわゆるプロテアーゼK/フェノール法 (Molecular cloning: A Laboratory manual Appendix E3 ~E4 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989))。

【0005】 試料にチオシアン酸グアニジン及びフェノールからなる混合液を加えて細胞膜や細胞壁を破壊し、複合体の蛋白質を変性、可溶化して核酸を遊離させ、更にクロロホルムを添加して核酸を水相に分配させた後、分取した水相にエタノールやイソプロパノール等を添加して核酸を不溶化させる、いわゆるAGPC法 (Acid Guanidinium-thiocyanate Phenol-Chloroform method: Analytical Biochemistry 162:156-159, 1987)。

【0006】 試料に塩酸グアニジンやチオシアン酸グアニジンを加えて細胞膜や細胞壁を破壊し、複合体の蛋白質を変性、可溶化して核酸を遊離させ、エタノール等を

添加して遊離した核酸を不溶化させる、いわゆるグアニジン法 (Molecular cloning: A Laboratory manual 7.23 ~ 7.25, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, Analytical Biochemistry 162:463, 1987)。

【0007】試料に、核酸と親和性を有するグリコーゲンを含むヨウ化ナトリウムを加えて細胞膜や細胞壁を破壊し、複合体の蛋白質を変性、可溶化して核酸を遊離させ、イソプロパノールを添加して遊離した核酸及びグリコーゲンを不溶化させるヨウ化ナトリウム法 (Nucleic Acid Res. 19(20):5792, 1991)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】プロテアーゼK/フェノール法は、蛋白分解酵素による分解処理に時間がかかり、酵素反応を良好に保つために温度管理を行わなければならない等、操作が煩雑である。しかも、フェノールやクロロホルムは有毒な化学試薬であり (両者共に毒物劇物取締法に指定される劇物である)、その取扱いには保護衣、手袋及び防煙フード等の使用が必要で、更に抽出操作後の廃液を特別処理しなければならない等、この廃液処理に費用、時間、特別な設備が必要となる。また、核酸が分配された水相の分取等に熟練を要し、安定した核酸抽出効率を達成することが困難である。

【0009】AGPC法においても、フェノールやクロロホルムの取扱いや、核酸が分配された水相の分取等に関する抽出効率等について、前記プロテアーゼK/フェノール法と同様の課題がある。更にこの方法はRNAを抽出するための方法であり、DNAの抽出には不適當である。

【0010】グアニジン法では、試料に塩酸グアニジン等を加えた後、エタノール等を添加する際、溶液中のグアニジン濃度が低下するため、高濃度 (6~8M程度) のグアニジンを使用しなければならないが、このためグアニジン塩が析出 (特に冬場や室温が20℃以下の場合) しやすいという課題がある。グアニジンの析出は、その添加に使用するピペッター等に目詰まりを発生させることにもつながり、該操作を機械化する際の課題となる。更に、グアニジンに続いて添加するエタノール等は、核酸の不溶化のため最終濃度で50~70%となるようにしなければならないが、グアニジンの添加で試料容量が増加しているから、高純度 (約100%) エタノールを使用しても、グアニジン-試料混合液と同量以上が必要になるという課題もある。

【0011】ヨウ化ナトリウム法では、蛋白質等を可溶化するため60℃のインキュベーションが必要で、RNAの抽出効率が低いという課題や、不安定なヨウ素イオン (I⁻) が光等により酸化され、分子状のヨウ素 (I₂) となり易いため、試薬を冷暗所で保管する必要があるという課題もある。

【0012】ところで、ポリメレーズ連鎖反応 (polyme-
rase chain reaction, PCR) とよばれるDNA増幅法

(Molecular cloning: A Laboratory manual chap14, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) では、超高感度の遺伝子検査 (遺伝子診断) が可能である。PCRでは、DNA増幅が良好に行われた場合には、1億倍以上の増幅が見込める。しかし、1分子のDNAであっても増幅が可能であるから、PCR用核酸試料やPCR試薬に本来存在するはずのないDNA (外来DNA) が混入すると、検査結果に重大な影響が生じることになる。

10 【0013】外来DNAの混入の原因の一つは、試料から核酸を抽出してPCR用核酸試料を準備する段階で発生するが、これは核酸抽出操作で発生するエアロゾルにも関係する。プロテアーゼK/フェノール法やAGPC法では、試薬を試料に添加して混合等する操作に加え、水相を分取する等、時間を要する操作も必要になるため、前記エアロゾルが発生し易いという課題もある。エアロゾルの粒子は直径約20ミクロンで、容量にすればおよそ $4 \times 10^{-6} \mu\text{l}$ 程度とわずかであるが、例えばB型肝炎患者の場合、血液1 μl 中に 10^5 程度のウイルス粒子が含まれることから、エアロゾル1個に1個のウイルス粒子が含まれることになる。1分子のDNAの増幅可能なPCRにおいては重大な障害が生じるのである。従って、処理工程を少なくする必要がある。

【0014】エアロゾルの発生を極力排除するため、例えばヨーロッパ公開487218号公報に記載された発明のように、インターカレーター性蛍光色素等を利用して、密封状態でPCR反応を実施することも知られている。しかしながら、核酸の抽出工程でのエアロゾル汚染の可能性までを排除することはできない。

30 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者は、従来の核酸抽出法に見られる改善されるべき課題を解決すべく鋭意研究した結果、操作が容易で工程が少なく、エアロゾル発生の可能性を減少でき、短時間で実施可能で、フェノールやクロロホルムを使用せず、核酸抽出効率が安定な、DNA及びRNAの抽出方法を完成するに至った。また本発明者は、この核酸抽出方法に基づき、従来法に比較してより簡便でかつエアロゾル汚染を排除し得る特定核酸配列の検出方法を完成するに至った。

40 【0016】すなわち本発明は、(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアを試料と混合して混合液を形成する工程、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、tert-ブチルアルコール及びtert-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、
50 を含む試薬Cを工程(1)の混合液に混合して核酸及び

キャリアーを不溶化する工程、(3) 不溶化された核酸及びキャリアーを液相と分離する工程との3つの工程からなる核酸抽出法である。

【0017】また本発明は、(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアーを試料と混合して混合液を形成する工程、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール及び*tert*-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、とを含む試薬Cを、工程(1)の混合液に混合して核酸及びキャリアーを不溶化する工程、(3) 不溶化された核酸及びキャリアーを液相と分離する工程、(4) 分離された核酸がRNAである場合に逆転写反応により該RNAをDNAに変換する工程、(5) 工程(3)で分離された核酸又は工程(4)で得られた核酸を、少なくとも

特定配列を増幅するのに適したオリゴヌクレオチドプローブ、モノヌクレオチド三リン酸混合物、ポリメラーゼ及びインターカレーター性蛍光色素を含むポリメラーゼチェーンリアクション反応液中でPCR反応に供する工程、(6) PCR反応前後の蛍光強度変化又はPCR反応中の反応液からの蛍光強度変化を測定する工程、

(7) 蛍光強度の変化から、試料中に特定配列を有する核酸が存在していたか否かを判定する工程、からなる特定核酸配列の検出方法である。

【0018】さらに本発明は、少なくとも次のキャリアー及び試薬を分離された状態で含む、核酸を抽出するための試薬セットを提供する。(1) デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種以上のキャリアー、(2) チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール及び*tert*-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、とを含む試薬C。

【0019】以下、本発明を詳細に説明する。

【0020】本発明は、一本鎖又は二本鎖のDNA、RNA等の核酸の抽出法であり、DNAはゲノムDNAの他、ミトコンドリアや葉緑体のDNA、RNAはmRNAの他、tRNAやrRNAの抽出に適用できる。このような核酸を含む試料としては、例えば白血球細胞等の生体由来試料、例えば遺伝子組み換え等で得られたベクター等を含む宿主細胞の培養物、ウイルスやファージの感染細胞及び血中のウイルス、単なる微生物の培養物である。培養物は、微生物等を含むものでもその上清のみ

のものでも良く、また人工的な培養物以外に自然に発生した培養物等でも良い。微生物等を含む試料において、微生物等が塊状になっている場合等には、必要に応じて例えばホモジナイズや超音波処理を実施することで良好な抽出効率を達成することができる。

【0021】本発明によれば、これらの試料から核酸を抽出することができるが、それ以外にも例えば、PCR反応溶液から、酵素や低分子のデオキシヌクレオチドリフォスフェート及びプライマー等を含まない、増幅された核酸を高収率で抽出することも出来る。

【0022】核酸を含有する試料に、まずキャリアーを混合する。キャリアーを混合することで、後に試薬Cを添加して核酸及びキャリアーを不溶化した際、不溶化された核酸とキャリアーの絡み合いにより大きな不溶化物が形成され、結果として後の不溶化物の分離操作が簡便化されることから、キャリアーを使用しない場合と比較して抽出効率を向上することができる。

【0023】キャリアーとは、核酸と親和性を有しており、試薬C中の試薬Bと接触した際に不溶化されるものである。またキャリアーは、核酸と一緒に抽出されるので、抽出した核酸の用途、例えば制限酵素反応、逆転写反応又はPCR反応への使用においてこれら反応を阻害しないものを選択する。本発明において使用されるキャリアーは、デキストラン、アクリルアミド及びカルボキシメチルセルロースからなる群から選ばれる1種又は2種以上である。これらキャリアーは単独でも、2種以上を混合した場合でも、十分な効果を有しており、しかも逆転写反応、PCR反応等を阻害しない。従来使用されているグリコーゲン等では、試料が血清や血液の場合、これら試料に含有されるアミラーゼ等の酵素により分解されてしまい、結果として核酸抽出効率が低下するが、本発明のキャリアーは分解されず、核酸抽出効率が低下することはない。

【0024】キャリアーは、試料10 μ lに対して0.01~1000 μ g程度、好ましくは0.1~100 μ g程度を添加すると良い。なおキャリアーを予め容器に添加しておき、該容器に試料を加えるようにしても、この逆のようにしても良い。またキャリアーは、凍結乾燥又は風乾により固形状にしておくことも出来る。

【0025】キャリアーを混合した混合液に、次にチオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種以上の試薬Aと、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、及び*tert*-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種以上の試薬B、を含む試薬Cを加えて混合し、キャリアー及び核酸を不溶化する。

【0026】試薬Cは、例えば核酸の分解を抑えるための適当な緩衝剤や、核酸分解酵素(デオキシリボヌクレ

アーゼ) 活性を抑制し得るクエン酸ナトリウム、EDT A等のキレート剤や、蛋白質や脂質等をより効率的に変性、可溶化するための、ジスルフィド結合を還元するジチオスレイトール、β-メルカプトエタノール等の還元剤や、蛋白質等をより効率的に可溶化するためにサルコシル塩、トライトン等の界面活性剤を含んでいても良い。試薬CのpHは、例えば適当な緩衝剤等を添加して、pH4~9、より好ましくはpH5~8としておくことで核酸の分解を防止でき、結果として抽出効率をより向上することができる。

【0027】本発明では、試薬Aとして、チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種又は2種以上を使用する。これらの試薬Aは、細胞膜や細胞壁を破壊し、複合体中の蛋白質を変性し、この結果生じる変性蛋白質等や、共存する試薬Bによって変性蛋白質が生じた場合にはこれをも可溶化でき、同時に試料中に存在し得るデオキシリボヌクレアーゼやリボヌクレアーゼ等の核酸分解酵素の活性をも抑制し得る。本発明の試薬Aは蛋白質を可溶化する能力に優れており、単独でも、また2種以上を組み合わせ使用しても、なんら不都合な反応を生じることなく、高い効率で核酸抽出を行うことができる。例えばヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、臭化カリウム、臭化ナトリウム、尿素等の一般に知られた蛋白質変性剤では蛋白質等を可溶化する力が弱く、また硫酸グアニジン、炭酸グアニジン等では蛋白質等を凝集させてしまうため、高い効率で核酸抽出を行うことができない。

【0028】本発明では、試薬Bとして、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、tert-ブチルアルコール及びtert-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種又は2種以上を使用する。ここで、2種以上を使用する場合には、予め予備的な実験を行い、混合する割合などを決定することが好ましい。本発明の試薬Bは、水に対する溶解度が高く水と相分離を生じ難いため、これを使用することで不溶化された核酸及びキャリアを水相から分離する操作を簡便化できる。このことは結果的に、本発明の最終工程において不溶化された核酸の回収率を向上し得ることを意味する。

【0029】試薬C中の、試薬A及び試薬Bのそれぞれの濃度は、キャリアを混合した試料に試薬Cを添加した際、蛋白質や脂質等は可溶化された状態にあるが核酸及びキャリアは不溶化されるように調整すれば良い。特に抽出効率を向上するうえで好ましい濃度は、試料に添加した場合の濃度(最終濃度)で、試薬Aが1.5~4.5M、試薬Bが40~80%程度である。

【0030】例えば、試薬Cを構成する試薬Aとしてチオシアン酸グアニジンを、試薬Bとしてイソプロピルアルコールを使用した場合の、特に高い効率で核酸を抽出

するための試薬濃度は、試料を混合した際のチオシアン酸グアニジン最終濃度が2~3Mで、試料に混合した際のイソプロピルアルコール最終濃度が45~55%程度である。チオシアン酸グアニジン最終濃度が1.5M以下では、試料に含まれる蛋白質や脂質等を十分に可溶化することが出来ず、また4.5M以上にするには試薬C中の試薬Aの濃度を高めなければならないが、そうすると試薬Aが析出しやすくなり調製が困難である。またイソプロピルアルコール最終濃度が40%以下ではキャリア及び核酸を十分不溶化することが出来ず、またイソプロピルアルコール最終濃度が80%以上では、蛋白質や脂質等を十分可溶化出来るだけの、チオシアン酸グアニジン濃度を調製するのが困難であり、さらにイソプロピルアルコールの蒸発が問題となるため、本発明では前記濃度範囲の試薬を使用することが好ましい。

【0031】試薬Cの添加量は、例えば試料が血清等の場合は試料容量の2~10倍量とすることが適当であるが、試料が高濃度の蛋白質や脂質等を含む場合は十分に可溶化するために試料容量の10倍以上添加すると良い。

【0032】以上の工程で試料中の核酸及びキャリアは不溶化されるから、続いて蛋白質等を含む水相から不溶化された核酸及びキャリアを遠心分離や濾過等の通常の分離操作を実施して分離する。遠心分離を行った場合には、核酸をペレットとして容器底に得ることができ、濾過を行った場合、濾過膜上に得ることができる。なお濾過膜としては、0.1~10μm程度の孔を有するものが使用できる。

【0033】分離された核酸は、そのまま種々の検査や遺伝子組み換えに使用することができるが、それに先立って洗浄することが好ましい。特に、例えば分離された核酸について酵素反応(例えば制限酵素反応、逆転写反応、PCR反応等)を行う等、沈殿物中にわずかに含まれる試薬A等が反応主体である酵素活性を阻害する恐れがある場合等に有効である。具体的には、例えば遠心分離又は濾過で取得された沈殿物について塩及びアルコールを含む溶液を添加混合し、再度遠心分離又は濾過に供することが例示できる。この場合、単に蒸留水等で洗浄した場合に比較して、試薬Aやペレット表面の残存蛋白質等を効率良く除去できる。塩としては塩化カリウム、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム等を0.05~0.5M程度を含有し、アルコールとしては例えばエタノールなら50%以上、好ましくは60~80%、n-プロピルアルコールやイソプロピルアルコールであれば30%以上、好ましくは40~60%が良い。

【0034】この他、特に沈殿物中に残存する蛋白質を除去する必要がある場合には、まず沈殿物に本発明の試薬Aを含む溶液を再添加し、該蛋白質を溶解し、本発明の試薬Bを含む溶液を添加し、再度遠心分離又は濾過を行えば良い。むろん、本発明の(2)以降の工程をその

10

20

30

40

50

まま繰り返しても良い。なお、極微量の核酸を抽出する場合には、操作全体を低温室中で行う等して、試料温度が低い状態で本発明を実施することが好ましい。

【0035】本発明は更に、以上のようにして抽出された核酸について、それが例えばB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス等の核酸中に見出だされる、他の核酸と識別し得る特定配列を含むか否かを判定するための、一般にPCR反応と呼ばれるDNA増幅方法を利用した検出方法をも提供する。なお本明細書においては、ヨーロッパ公開特許第487218号明細書の開示事項を引用する。

【0036】この方法においては、前述のように分離され、好ましくは洗浄された核酸について、まず分離された核酸がRNAである場合には、逆転写反応により該RNAをDNAに変換する。例えばC型肝炎ウイルス等では、遺伝子としてRNAを有している。一方本発明では、DNAを増幅するためのPCR反応を利用するため、以下に述べる増幅工程に先立ち、RNAを増幅し得るDNAに変換する。この工程は、通常の逆転写反応により、分離したRNAを鋳型としてDNAを合成することにより達成できる。

【0037】次に、分離された核酸又は前記工程で逆転写反応により得られた核酸を、少なくとも特定配列を増幅するのに適したオリゴヌクレオチドプローブ、モノヌクレオチド三磷酸混合物、ポリメラーゼ及びインターカレーター性蛍光色素を含むポリメラーゼチェーンリアクション反応液中でPCR反応に供する。ここでオリゴヌクレオチドプローブは、適当な塩基長を有し、PCR反応が進行した場合に、特定配列を含むDNA断片を産出するために必要な、最終的に産出されるDNA断片の5'末端に位置すべき2種以上のオリゴヌクレオチドであり、検出しようとする特定配列に応じて、適宜選択することができる。

【0038】本発明で使用するインターカレーター性蛍光色素としては、例えばエチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ、ビスベンチミド、ジアミノフェニルインドール、アクチノマイシン、チアゾール、クロモマイシン並びにこれらの誘導体等を例示できる。PCR反応それ自体は、特定配列及び該配列に相補的配列のそれぞれの3'末端側部分に、それぞれ相補的なオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせた状態でポリメラーゼによる5'末端から3'末端への伸長反応を行い、産生する二重鎖を解離させる操作を1サイクルとし、これを適当回数繰り返せば良い。

【0039】蛍光強度変化は、PCR反応前後又はPCR反応中のPCR反応液について測定する。インターカレーター性蛍光色素は、二重鎖DNAに取り込まれることで蛍光特性が変化するため、PCR前後又はPCR反応中の蛍光強度は、分離されたDNA又はRNAが特定配列を有しているか否かを示すのである。

【0040】以上の特定配列の検出方法においては、PCR反応を開始した後は試薬を追加する必要がない。従って、例えばPCR反応液を添加した容器を用意し、これに抽出した核酸又はそれを逆転写反応することで得られた核酸を該容器に添加した後は、容器を完全に密封し、密封状態でPCR反応工程及び蛍光強度測定工程を実施すれば、エアロゾルの発生確率をより減少させることができる。

【0041】そして本発明は、上記で説明してきた核酸抽出を実施するための試薬セットをも提供する。該試薬セットは、先に説明したキャリアー及び試薬Cを含むもので、これらは、実際に使用されるまで分離された状態に維持される。例えば、キャリアーは固体状で、そして試薬Cは液体状で、それぞれ別の容器に封入されているような形態が例示できる。

【0042】本発明の試薬セットは、本発明の核酸抽出法や、核酸の特定配列の検出方法において反応空間を提供しうる、適当なプラスチック材料で構成された反応管などを含んでもよい。特に核酸の特定配列の検出をも行う場合には、密封可能な前記反応管を含むことが好ましい。

【0043】このように、試薬セット中に反応管が含まれる場合には、例えばキャリアーを該管中に凍結乾燥等して添加しておくことで、単に試料を添加し、後に試薬Cを添加するのみで核酸抽出などが可能な試薬セットが提供される。

【0044】

【実施例】以下、本発明を更に詳細に説明するために実施例を記載するが、本発明はこれら実施例に限定されるわけではない。

実施例1 培養細胞からの核酸の抽出

マウスの骨髄腫細胞とCEA(癌胎児性抗原)で感作したマウスのリンパ球細胞とのハイブリドーマ細胞をDMEM培地で培養した。培養液1ml当たりCEL細胞が40万となった時点で、100 μ lの培養液を容量0.5mlのサンプリングチューブに取得し、7000rpmで1分間遠心分離し上清を除去後、培地20 μ lで懸濁した。懸濁液に対してデキストラン(分子量50万)1 μ l(10 μ g)を添加し混合後、試薬C(2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、0.3%N-ラウロイルサルコシナトリウム、60%イソプロピルアルコール)を100 μ l添加後、20秒程攪拌し、続いて15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、沈殿物に200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを100 μ l添加し、20秒程攪拌し、続いて15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て沈殿物に核酸を抽出した。またこの沈殿物について KissaneとRobinsの蛍光法(J.Biol.Chem. 233:184, 1958)によりDNA量を測定した。さらに沈殿物を灰化处理した後、

リン定量 (Anal. Chem. 28:1756, 1956) により沈殿物中の総核酸量 (DNA+RNA量) を測定した。RNA量は、総核酸量 (DNA+RNA量) からDNA量を減じて算出した。

【0045】比較のためプロテアーゼK/フェノール法およびAGPC法で同一試料から核酸を抽出した。

【0046】プロテアーゼK/フェノール法は、Keller, G.Hらによる方法 (Anal. Biochem. 170:441-450, 1988) に従った。まず容量0.5ml サンプリグチューブ中の細胞懸濁液20 μ lに、試薬 (150mM塩化ナトリウム、10mM EDTA、10mMトリスpH 8、2% SDS、250 μ g/ml プロテアーゼK) を40 μ l添加し20秒程攪拌し、50℃で1時間インキュベーションした。次に溶液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1) を60 μ l添加し20秒程攪拌する。10分間、15000rpmで遠心分離した。上清 (水相) を40 μ l分取し、4M酢酸カリウムを8 μ l添加し、さらにグリコーゲン10 μ g (1 μ l) とイソプロピルアルコールを50 μ l添加し攪拌した後、-20℃で30分間冷却した後、上清を捨て、沈殿物に75%エタノールを100 μ l添加し攪拌した。4℃で20分間遠心分離して上清を捨て沈殿物に核酸を抽出した。

*

抽出法	DNA (μ g)	RNA (μ g)	DNA+RNA (μ g)
本発明	2.9	1.4	4.3
プロテアーゼK /フェノール法	1.6	0.7	2.3
AGPC法	0.2	1.0	1.2

実施例2 大腸菌からの抽出

大腸菌 (JM109) をL-Broth培地で培養した。培養液1ml当たり大腸菌 2×10^8 となった時点で、1mlの培養液を容量1.5mlのサンプリグチューブに取得し、7000rpmで1分間遠心分離し上清を除去後、培地50 μ lで懸濁した。懸濁液に対してデキストラン2 μ l (分子量50万、20 μ g) を添加し混合後、試薬C (2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、0.3% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、60%イソプロピルアルコール) を250 μ l添加後、20秒程攪拌し、続いて15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、沈殿物に200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを250 μ l添加後、20秒程攪拌し、続いて15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て沈殿物に核酸を抽出した。実施例1と同様にDNA量および総核酸量 (DNA+RNA量) を測定し、RNA量を算出した。結果を表2に示す。 ※50

* 【0047】AGPC法は、Chomczynski, P. による方法 (Anal. Biochem. 162:156-159, 1987) に従った。まず容量0.5ml サンプリグチューブ中の細胞懸濁液20 μ lに、試薬 (6Mチオシアン酸グアニジン、37.5mMクエン酸ナトリウム、0.75% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、0.15M 2-メルカプトエタノール) を40 μ l添加し20秒程攪拌し、さらに2M酢酸ナトリウム (pH4) を6 μ l添加し20秒程攪拌した。次に水で飽和したフェノールを6 μ l添加し20秒程攪拌した。次に溶液 (クロロホルム:イソアミルアルコール=49:1) を12 μ l添加し20秒程攪拌した。次に混合溶液を15分間氷水中で冷却した後、4℃で20分間、15000rpmで遠心分離した。上清 (水相) を60 μ l分取しイソプロピルアルコールを60 μ l添加し攪拌した後、-20℃で1時間冷却した。冷却後、上清を捨て、沈殿物に75%エタノールを100 μ l添加し攪拌した。最後に4℃で20分間遠心分離して上清を捨て沈殿物に核酸を抽出した。沈殿物を上記と同様に分析した。結果を表1に示す。表1によれば本発明の方法は、抽出効率の面において優位性を示した。

【0048】

【表1】

※す。

【0049】

【表2】

DNA (μ g)	RNA (μ g)	DNA+RNA (μ g)
4.4	36.6	41.0

実施例3 B型肝炎ウイルスDNAの抽出

デキストラン1 μ l (分子量50万、10 μ g) を分注した容量0.5mlのサンプリグチューブにB型肝炎患者血清20 μ lを分注し、試薬C (2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコール) を100 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを100 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間

遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。

【0050】この沈殿物に対し、PCR試薬（宝酒造（株）製）を25 μ l分注し、DNA Thermal Cycler（Perkin-Elmer-Cetus社製）を用いて40サイクルのPCRを行った。なおその条件は以下の通りである（以下のプライマーはB型肝炎ウイルス（HBV）の核酸を特異的に増幅するためのプライマーである）。

【0051】各サイクルの時間

変性	94℃	1分
アニーリング	55℃	45秒
合成	72℃	1分

プライマーの塩基配列

5' -GGACTTCTCTCAATTTTCTAGG
G-3'

5' -CAAATGGCACTAGTAAACTGAG
C-3'

PCR反応終了後電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドの濃さを確認した。結果を図1に示す。

実施例4 C型肝炎ウイルスRNAの抽出

デキストラン1 μ l（分子量50万、10 μ g）を分注した容量0.5mlのサンプリングチューブにC型肝炎患者血清20 μ lを分注し、試薬C（2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコール）を100 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを100 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。

【0052】この沈殿物に対し、逆転写試薬（宝酒造（株）製）を10 μ l分注し溶解後、DNA Thermal Cycler（Perkin-Elmer-Cetus社製）で逆転写反応を行った。なお、その条件は以下のとおりである。

【0053】

アニーリング	25℃	10分
合成	42℃	30分
逆転写酵素失活	99℃	5分
保存	25℃	

次に上記逆転写反応溶液5 μ lにPCR試薬20 μ lを分注し、DNA Thermal Cycler（Perkin-Elmer-Cetus社製）で40サイクルのPCRを行った。その条件は以下のとおりである（以下のプライマーは、C型肝炎ウイルス（HCV）の核酸を特異的に増幅するためのプライマーである）。

【0054】

各サイクルの時間

変性	95℃	30秒
アニーリング	65℃	30秒

合成 72℃ 1分

プライマーの塩基配列

5' -CTCCACCATAGATCACTCCCC-
3'

5' -GCACTCGCAAGCACCCCTAT-
3'

PCR反応終了後電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりバンドの濃さを確認した。結果を図2に示す。

10 実施例5 C型肝炎ウイルスRNAの抽出

デキストラン2 μ l（分子量50万、20 μ g）を分注した容量1.5mlのサンプリングチューブにC型肝炎患者血清100 μ lを分注し、試薬C（2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコール）を500 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで3分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを200 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。

【0055】この沈殿物に対し、逆転写試薬20 μ l分注し溶解後、実施例4と同じ条件で逆転写反応を行った。次に上記逆転写反応溶液10 μ lにPCR試薬40 μ lを分注し実施例4と同じ条件でPCR反応をおこなった。

【0056】比較のため、ヨウ化ナトリウム法（Ishizawa, Mらによる方法、Nucleic Acid Res. 19(20):5792, 1991）で抽出した。まず容量1.5mlのサンプリングチューブにC型肝炎患者血清100 μ lを分注し、試薬（6M NaI、13mMEDTA、0.5% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、10 μ g グリコゲン、Tris-HCl pH11A）を300 μ l添加後、20秒程攪拌し、60℃で15分間インキュベーションした。インキュベーション後、イソプロピルアルコールを400 μ l添加後、20秒程攪拌し15分間静置した。静置後、15000rpmで5分間遠心分離して上清を捨てた。

次に40%イソプロピルアルコールを1000 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで5分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。この沈

殿に対し上記と同様に逆転写反応及びPCRを行った。PCR反応終了後、PCR反応溶液10 μ lを高速液体クロマトグラフィー（東ソー（株）製）で分析した。カラムには、ゲル濾過クロマトグラフィー用TSK Gel、G4000SWを用い、260nmの紫外吸収（UV8000、東ソー（株）製）にて検出した。溶離液にはリン酸カリウム緩衝液（0.1M, pH6.8）、流量1ml/minを用いた。結果を表3に示す。本発明の方法ではPCR反応溶液10 μ l当たりPCR増幅産物は平均26ngであったのに対し、ヨウ化ナトリウム法では3ngであった。

【0057】

【表3】

PCR増幅産物量 (ng)		平均
本 法	27	26
	25	
	26	
ヨウ化ナトリウム法	4	3
	3	
	2	

実施例6 B型肝炎ウイルスDNAの抽出

デキストラン1 μ l (分子量50万、10 μ g) を分注した容量0.5mlのサンプリングチューブにB型肝炎患者血清20 μ lを分注し、以下に示した試薬Cをそれぞれのサンプルに添加混合した。

【0058】①2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

②2. 4Mチオシアン酸カリウム、15mMクエン酸ナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

③3. 2M塩酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

試薬Cを添加混合後、15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロパノールを100 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。以上の溶液を使用して抽出した核酸について、実施例3と同じ条件でPCRを行い、反応終了後、電気泳動でバンドの濃さを比較した。結果を図3に示す。その結果、これら試薬Cを用いた場合、①～③についてバンドの濃さはほぼ同等であった。

実施例7 B型肝炎ウイルスDNAの抽出

デキストラン1 μ l (分子量50万、10 μ g) を分注した容量0.5mlのサンプリングチューブにB型肝炎患者血清20 μ lを分注し、以下に示した試薬Cをそれぞれのサンプルに添加混合した。

【0059】①2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び60%n-プロピルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

②2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

③3Mチオシアン酸グアニジン、19mMクエン酸ナトリウム、75mM 2-メルカプトエタノール、0.38%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び50%n 50

ーブチルアルコールを含む試薬Cを80 μ l、

④2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び60%n-ブチルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

⑤3Mチオシアン酸グアニジン、19mMクエン酸ナトリウム、75mM 2-メルカプトエタノール、0.38%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び50%sec-ブチルアルコールを含む試薬Cを80 μ l、

⑥2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び60%sec-ブチルアルコールを含む試薬Cを100 μ l。

【0060】試薬Cを添加混合後、15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロパノールを100 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。以上の溶液を使用して抽出した核酸について、実施例3と同じ条件でPCRを行い、反応終了後、電気泳動でバンドの濃さを比較した。結果を図4に示す。その結果、これら試薬Cを用いた場合、①～⑥についてバンドの濃さは同等であった。

実施例8 B型肝炎ウイルスDNAの抽出

デキストラン1 μ l (分子量50万、10 μ g) を分注した容量0.5mlのサンプリングチューブにB型肝炎患者血清20 μ lを分注し、以下に示した試薬Cをそれぞれのサンプルに添加混合した。

【0061】①3Mチオシアン酸グアニジン、19mMクエン酸ナトリウム、75mM 2-メルカプトエタノール、0.38%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び50%tert-アミルアルコールを含む試薬Cを80 μ l、

②2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び60%tert-アミルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

③2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシンナトリウム及び60%tert-ブチルアルコールを含む試薬Cを100 μ l、

④2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM2-メルカプトエタノール、0.3%N-ラウロイルサルコシナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬Cを100 μ l。

【0062】試薬Cを添加混合後、15000rpmで2分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロパノールを100 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。以上の溶液を使用して抽出した核酸につ

いて、実施例3と同じ条件でPCRを行い、反応終了後、電気泳動でバンドの濃さを比較した結果を図5に示す。その結果、これら試薬Cを用いた場合、バンドの濃さは同等であった。

実施例9 C型肝炎ウイルスRNAの抽出

容量1. 5mlのサンプリングチューブにアクリルアミド(分子量約70万)溶液0.0.5.1.2.5 μ l(0.5.10.20.50 μ g)およびデキストラン(分子量50万)2 μ l(20 μ g)をそれぞれ分注し、さらにC型肝炎患者血清100 μ lを分注後、5秒程攪拌する。次に試薬C(2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコール)を500 μ l添加後、20秒程攪拌する。15000rpmで3分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、沈殿物に200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを200 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで3分間遠心分離して上清を捨て沈殿物に核酸を抽出した。

【0063】この沈殿に対し、逆転写試薬20 μ l分注し溶解後実施例4と同じ条件で逆転写反応を行った。次に上記逆転写反応溶液10 μ lにPCR試薬40 μ lを分注し実施例4と同じ条件でPCR反応をおこなった。PCR反応終了後、実施例5と同様にPCR反応溶液10 μ lを高速液体クロマトグラフィー(東ソー(株)製)で分析した。分析結果を表4に示す。

【0064】核酸共沈物質であるアクリルアミドが無い場合は、C型肝炎ウイルスRNAが抽出されないため、PCR反応による増幅産物が検出されなかった。アクリルアミドを20 μ g以上添加した場合は、PCR反応による増幅産物が約35ナノグラム検出された。デキストランを20 μ g添加した場合は、PCR反応による増幅産物が約44ナノグラム検出された。

【0065】

【表4】

アクリルアミド 添加量(μ g)	PCR増幅 産物量(ng)
0	0
5	26
10	33.5
20	35
50	35
デキストラン 添加量(μ g)	
20	44

実施例10 B型肝炎ウイルスDNAの抽出

デキストラン(分子量50万)を、0.0.2.0.4.0.8.1.6.3.2.6.4 μ l(0.2.4.8.16.32.64 μ g)を分注し、実施例4と同様に抽出操作およびPCR反応を行い、PCR反応終了後電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドの濃さを比較した。結果を図6に示す。その結果、核酸共沈物質であるデキストランが無い場合は、B型肝炎ウイルスDNAが抽出されないため、バンドが検出されなかった。デキストランを16 μ g以上添加した場合は、バンドの濃さはほぼ同等であった。

実施例11 B型肝炎ウイルスDNAの抽出

デキストランに代えてカルボキシメチルセルロース(SIGMA製:Lowviscosity)を1 μ l(10 μ g)使用した以外は実施例3と同様の抽出操作およびPCR反応を行い、PCR反応終了後電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドの濃さを比較した。結果を図7に示す。その結果、デキストランとカルボキシメチルセルロースのバンドの濃さはほぼ同等であった(参照のため、同時にデキストランを使用して抽出操作を行った場合の結果を合わせて図7に示す)。

実施例12 PCR反応産物への応用

容量1. 5mlのサンプリングチューブにデキストラン(分子量50万)溶液2 μ l(20 μ g)を分注し、HBV-PCR反応溶液20 μ lおよび水80 μ lを添加し混合した。次に試薬C(2. 4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60mM β -メルカプトエタノール、60%イソプロピルアルコール)を500 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで3分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、沈殿物に200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを100 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで3分間遠心分離して上清を捨て沈殿物に核酸を抽出した。水20 μ lを沈殿物に添加し溶解した。

【0066】抽出前および抽出後のPCR反応溶液10 μ lを、実施例5と同様に高速液体クロマトグラフィー(東ソー(株)製)で分析した。なお、カラムには、ゲル濾過クロマトグラフィー用TSKgel、G3000

SWを用いた。結果を図8に示す。図8によりPCR増幅産物およびプライマーオリゴマーがほぼ100%回収されていることが判明した。またプライマー、デオキシヌクレオチドトリホスフェートが除去されていることが判明した。

実施例13 抽出した核酸を用いたPCR反応
デキストラン（分子量50万）2 μ l（20 μ g）を分注した容量1.5mlのサンプリングチューブにB型肝炎患者血清100 μ lを分注し、試薬C（2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコール）を500 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで3分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコールを200 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。この沈殿に対し、PCR試薬50 μ lを分注し実施例3と同じ条件でPCR反応をおこなった。

【0067】比較のため、実施例5と同様にヨウ化ナトリウム法（Ishizawa.Mらによる方法、Nucleic Acid Res. 19(20):5792, 1991）で核酸を抽出し、上記と同様にPCR反応を行った。PCR反応終了後、PCR反応溶液を10 μ lを実施例5と同様に、高速液体クロマトグラフィー（東ソー（株）製）で分析した。分析結果を表5に示す。本発明の方法の場合PCR反応溶液10 μ l当たりPCR増幅産物は平均7.5ngに対し、ヨウ化ナトリウム法では4.3ngであった。なお、表中には各方法につき、4サンプルずつ行った平均値を記載した。

【0068】

【表5】

PCR増幅産物量 (ng)	
本 法	7.5
ヨウ化ナトリウム法	4.3

キャリアー	PCR増幅産物量 (ng)
デキストラン	37
デキストラン +アクリルアミド	33
アクリルアミド +カルボキシメチルセルロース	37

実施例15

デキストラン2 μ l（分子量50万、20 μ g）を分注した容量0.5mlのサンプリングチューブにB型肝炎患者血清100 μ lを分注し、以下に示す試薬Cをそれぞれのサンプルに添加混合した。

【0073】①2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコールを含む試薬Cを500 μ l、

*実施例14

容量1.5mlの各サンプリングチューブに以下に示したキャリアーを分注した。

【0069】①デキストラン2 μ l（分子量50万、20 μ g）、

②デキストラン1 μ l（分子量50万、10 μ g）及びアクリルアミド1 μ l（分子量70万、10 μ g）、

③アクリルアミド1 μ l（分子量70万、10 μ g）及びカルボキシメチルセルロース1 μ l（10 μ g、SIGMA製、Low viscosity）。

【0070】分注後、各サンプリングチューブにB型肝炎患者血清100 μ lを分注し、試薬C（2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、60%イソプロピルアルコール）を500 μ l添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで3分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコール200 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核酸を抽出した。

【0071】この沈殿に対し、PCR試薬50 μ lを分注し実施例3と同じ条件でPCR反応を行った。PCR反応終了後、PCR反応溶液を実施例5と同様に高速液体クロマトグラフィー（東ソー（株）製）で分析した。分析結果を表6に示す。キャリアーは単独でも、2種混合しても同程度にPCR増幅されていた。なお、表には各方法につき、4サンプルずつ行った平均値を記載した。

【0072】

【表6】

30

*

②2.4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム、30%イソプロピルアルコール、30%tert-ブチルアルコールを含む試薬Cを500 μ l。

【0074】試薬Cを添加後、15000rpmで3分間遠心分離して沈殿物に核酸を抽出した。上清を捨て、200mM塩化カリウムを含む40%イソプロピルアルコール200 μ lを添加後、20秒程攪拌し、15000rpmで1分間遠心分離して上清を捨て、沈殿物に核

50

酸を抽出した。

【0075】この沈殿に対し、PCR試薬50 μ lを分注し実施例3と同じ条件でPCR反応を行った。PCR反応終了後、PCR反応溶液を実施例5と同様に高速液体クロマトグラフィー（東ソー（株）製）で分析した。分析結果を表7に示す。試薬Cに含まれるアルコールがイソプロピルアルコール1種の場合、PCR反応溶液1*

試薬Cに含まれるアルコール	PCR増幅産物量 (ng)
イソプロピルアルコール	42
イソプロピルアルコール +tert-ブチルアルコール	33

【発明の効果】本発明では、チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、チオシアン酸カリウム及びチオシアン酸ナトリウムからなる群から選ばれる1種又は2種以上の試薬Aと、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、及びtert-アミルアルコールからなる群から選ばれる1種又は2種以上の試薬Bを最初から混合しておくことでこれら試薬の使用量を減少させることができる。例えば試料が10 μ lで、最終的に2Mの蛋白質変性剤と50%程度のイソプロパノールが含有された状態にするならば、グアニジン法では、例えば、6Mのグアニジン溶液を20 μ l添加し、続いて100%程度のイソプロパノールを30 μ l添加する必要がある。これに対して本発明では、3Mのチオシアン酸グアニジンを含む75%程度のイソプロパノールからなる核酸抽出試薬を20 μ l添加すれば済むのである。この結果、グアニジン法では、試料、2Mチオシアン酸グアニジン及び50%程度のイソプロパノールを含む60 μ lの溶液が出現するのに対し、本願発明では同濃度の溶液が30 μ l出現するだけである。従って、操作後に処理しなければならない廃液量も、本願発明では少なくすることができる。加えて、本発明ではフェノールやクロロホルム等を使用する必要がないから、その取扱い等が従来技術に比較して簡便である。

【0077】本発明では核酸を沈殿として得ることができ、従来のように互いに混合しない2種類の液体への核酸の溶解度の差に基づいて、核酸が溶解している液相を他方の液相から分離することによって核酸を抽出してくる方法に比べて、極めて簡単な操作で実施できる。従ってその実施には熟練を必要とせず、かつ常に安定して、高い効率で核酸を抽出することができる。

【0078】また本発明では、前記したように試料に添加する試薬C中の試薬Aの濃度を低下できるから、試薬Aの析出も防止でき、更には試薬Bの濃度を下げることができるからその揮発も防止できる。従って、本発明は機械を用いてこれを実施するのに都合が良い。一般に試薬Aや試薬Bは、単独では分注精度を向上することが難しいが、本発明の核酸抽出試薬では分注精度の向上を期※50

*0 μ l当たりのPCR増幅産物は平均42ngであるのに対し、イソプロピルアルコール及びtert-ブチルアルコールの2種を混合した場合、平均33ngであった。なお、表には各方法につき、2サンプルずつ行った平均値を記載した。

【0076】

【表7】

※待出来る。

【0079】本発明は、キャリアー、試薬A及びBを含む試薬Cを用いることで、上記効果に加え、従来方法に比較して高い抽出効率を達成し得る方法である。

【0080】また、本発明が提供する特定配列の検出方法は、PCR反応及び蛍光強度測定を密封容器内で実施し得るものである。従って、単なるPCR法により核酸を増幅し、増幅した核酸を検出する方法等に比較して、操作も簡便であり、しかもエアロゾル発生確率を減少することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法により抽出したB型肝炎ウイルス(HBV)DNAをPCRにより増幅した場合の電気泳動の結果を示す図である。レーン1、2：HBVを多量に含む血清；レーン3、4：HBVを少量含む血清；レーン5：HBVを含まない血清。なお、図1～図7において、下の写真は電気泳動の結果を示す写真であり、上はその模式図である。

【図2】本発明の方法により抽出したC型肝炎ウイルス(HCV)RNAから調製したDNAをPCRにより増幅した場合の電気泳動の結果を示す図である。レーン1、2：HCVを多量に含む血清；レーン3、4：HCVを少量含む血清；レーン5：HCVを含まない血清。

【図3】以下に示す各種試薬Cを用いて、本発明の方法によりB型肝炎ウイルスDNAを抽出し、PCRにより増幅した場合の電気泳動の結果を示す図である。レーン1、2：①2、4Mチオシアン酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬C；レーン3、4：②2、4Mチオシアン酸カリウム、15mMクエン酸ナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬C；レーン5、6：③3、2M塩酸グアニジン、15mMクエン酸ナトリウム及び60%イソプロピルアルコールを含む試薬C。

【図4】実施例7に示す試薬Cを用いて、本発明の方法によりB型肝炎ウイルスDNAを抽出し、PCRにより増幅した場合の電気泳動の結果を示す図である。なお、試薬Cに使用した試薬Bを以下に列記する。レーン1、2：①60%n-プロピルアルコール；レーン3、

23

4: ②60%イソプロピルアルコール; レーン5、6: ③50%n-ブチルアルコール; レーン7、8: ④60%n-ブチルアルコール; レーン9、10: ⑤50%sec-ブチルアルコール; レーン11、12: ⑥60%sec-ブチルアルコール。

【図5】 実施例8に示す試薬Cを用いて、本発明の方法によりB型肝炎ウイルスDNAを抽出し、PCRにより増幅した場合の電気泳動の結果を示す図である。なお、試薬Cに使用した試薬Bを以下に列記する。レーン1、2: ①50%tert-アミルアルコール; レーン3、4: ②60%tert-アミルアルコール; レーン5、6: ③60%tert-ブチルアルコール; レーン7、8: ④60%イソプロピルアルコール。

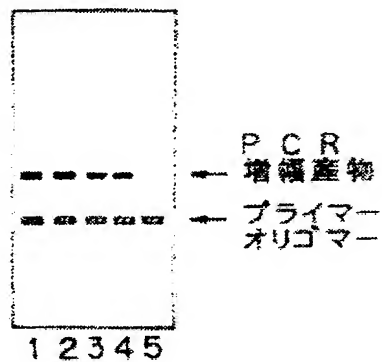
【図6】 本発明の方法によりB型肝炎ウイルスDNAを抽出しPCRにより増幅した場合の電気泳動の結果を示す図である。なお、それぞれの試験で添加したデキストランの量(μg)を以下に列記する。レーン1、2: *

*0 μg ; レーン3、4: 2 μg ; レーン5、6: 4 μg ; レーン7、8: 8 μg ; レーン9、10: 16 μg ; レーン11、12: 32 μg ; レーン13、14: 64 μg 。

【図7】 キャリヤーとしてデキストランまたはカルボキシメチルセルロースを用いて実施例3と同様にB型肝炎ウイルスDNAを抽出し、PCRにより増幅を行った場合の電気泳動の結果を示す図である。レーン1、2: デキストラン; レーン3、4: カルボキシメチルセルロース。

【図8】 実施例12における、高速液体クロマトグラフィーの結果(チャート図)を示す。図中、(a)は核酸抽出を行う前のPCR反応溶液についての、(b)は核酸抽出後のPCR反応液についての結果を示し、図中、横軸は溶出時間(分)を、縦軸は相対的吸光度を示す。

【図2】



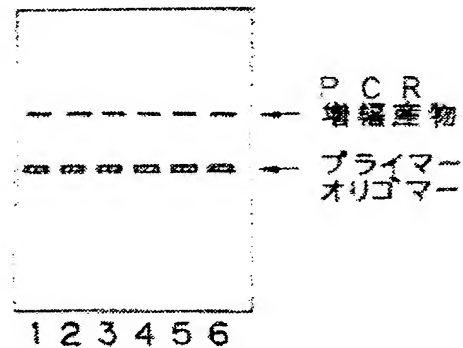
図面代用写真



1 2 3 4 5

写真

【図3】



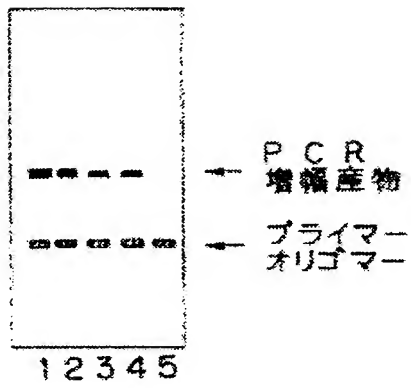
図面代用写真



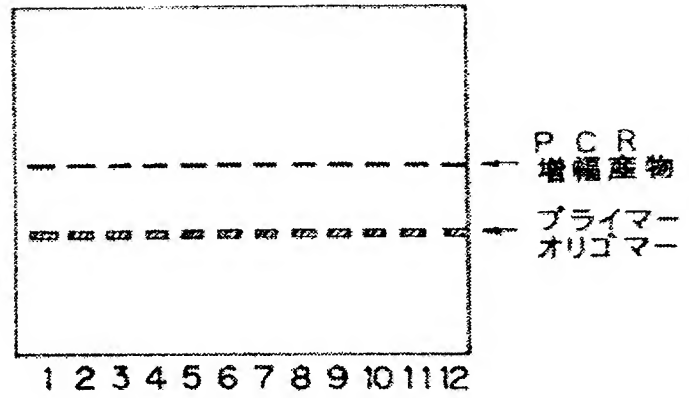
1 2 3 4 5 6

写真

【図1】



【図4】



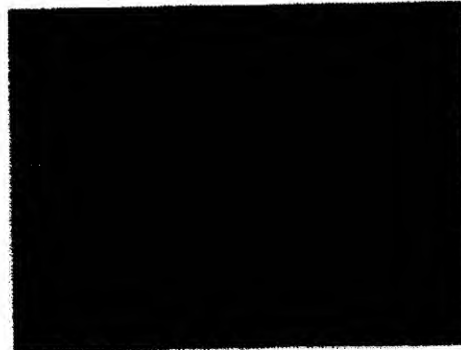
図面代用写真



1 2 3 4 5

写真

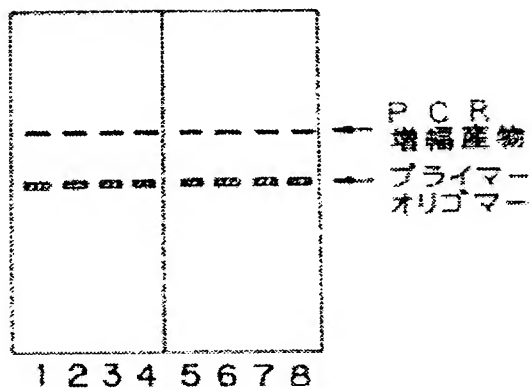
図面代用写真



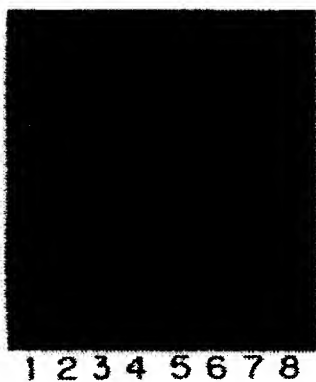
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

写真

【図5】

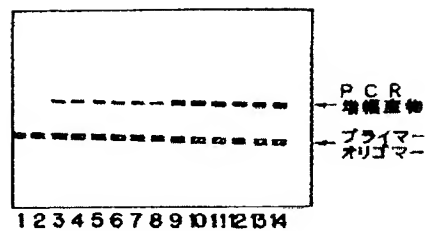


図面代用写真

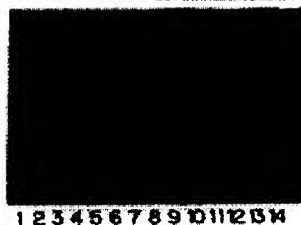


写真

【図6】

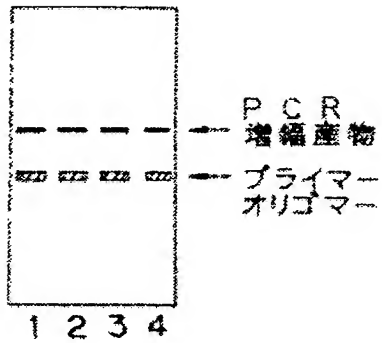


図面代用写真



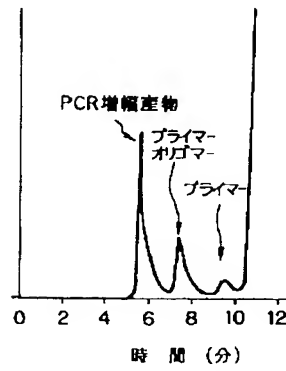
写真

【図 7】

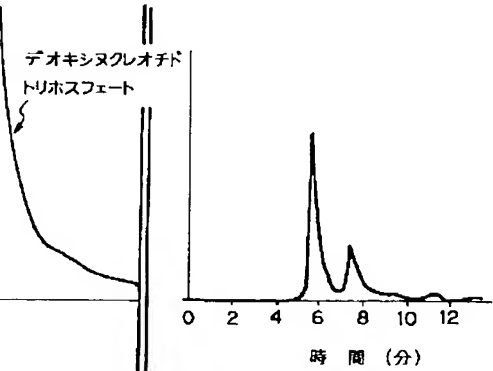


【図 8】

(a) PCR反応溶液抽出前



(b) PCR反応溶液抽出後



図面代用写真



写真

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

G 0 1 N 33/50

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

P